

007294643

WPI Acc No: 87-291650/198741

XRAM Acc No: C87-123872

Recombinant DNA prodn. of sugar nucleotide - by transforming host cells with portable vehicle contg. sequence expressing enzymes for product synthesis

Patent Assignee: BETLACH M R (BETL-I); GETTY SCI DEV CO (GETT-N)

Inventor: BETLACH M R; DOHERTY D H; VANDERSLICE R W; VANDERSLIC R W

Number of Countries: 003 Number of Patents: 007

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
WO 8705937	A	19871008	WO 87US605	A	19870324		198741 B
NO 8704879	A	19880222					198813
JP 1500560	W	19890301	JP 87502314	A	19870324		198915
EP 380470	A	19900808	EP 87902918	A	19870324		199032
EP 380470	B1	19950215	EP 87902918	A	19870324	C12P-019/02	199511
			WO 87US605	A	19870324		
DE 3751066	G	19950323	DE 3751066	A	19870324	C12P-019/02	199517
			EP 87902918	A	19870324		
			WO 87US605	A	19870324		
NO 179875	B	19960923	WO 87US605	A	19870324	C12N-015/00	199644
			NO 874879	A	19871123		

Priority Applications (No Type Date): US 86843349 A 19860324; US 8729091 A 19870323

Cited Patents: 4.Jnl.Ref; WO 8705938

Patent Details:

Patent	Kind	Lan	Pg	Filing Notes	Application	Patent
WO 8705937	A	E	45			WO 8705937
EP 380470	B1	E	39	Based on		EP 380470
DE 3751066	G			Based on		WO 8705937
				Based on		
NO 179875	B			Previous Publ.		NO 8704879

Abstract (Basic): WO 8705937 A

Recombinant DNA method for sugar nucleotide (I) prodn. comprises cloning at least one portable DNA sequence (A), able to direct an alternate host microorganism to produce (I), into a vector which can be transferred to, and replicated in, host microorganisms. These vectors contain elements for expression of enzymes coded for by (A). The vectors are used to transform suitable host microorganisms and the transformants cultured under conditions where the vectors will produce (I).

Also new are (1) plasmids able to direct expression of UDP-glucose pyrophosphorylase; UDP-glucose dehydrogenase; phosphoglucomutase; phosphomannose mutase and GDP-mannose pyrophosphorylase, specifically pA57, pA59 and pT513 and (2) the microorganisms Xanthomonas campestris X872 (ATCC 53471) and E.coli LE 392 transformed with the specified plasmids (ATCC 67050, 67048 and 67047, respectively).

USE/ADVANTAGE - The method is used to produce UDP-glucose, UDP-glucuronic acid and GDP-mannose, which are then incorporated into e.g. polysaccharides (esp. xanthan gum and modified forms), colonic acid (a potential synthetic antigen for use in vaccination) or antibiotics.

Title Terms: RECOMBINATION; DNA; PRODUCE; SUGAR; NUCLEOTIDE; TRANSFORM; HOST; CELL; PORTABLE; VEHICLE; CONTAIN; SEQUENCE; EXPRESS; ENZYME; PRODUCT; SYNTHESIS

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/00; C12P-019/02

International Patent Class (Additional): C12N-001/20; C12N-007/00;

C12N-015/63; C12P-019/12; C12P-019/30

File Segment: CPI

⑪ 公表特許公報 (A)

平1-500560

⑫ Int.CI.

C 12 P 19/30
C 12 N 1/20
15/60

識別記号

厅内整理番号
7236-4B
G-8515-4B
A-8412-4B※

審査請求 未請求

子審査請求 未請求

部門(区分) 1 (1)

(全 20 頁)

⑪ 公表 平成1年(1989)3月1日

⑬ 発明の名称 組換DNA法を用いる複スクレオチドの合成方法

⑭ 特願 昭62-502314

⑮ 出願 昭62(1987)3月24日

⑯ 請求文提出日 昭62(1987)11月17日

⑰ 国際出願 PCT/US87/00605

⑱ 國際公開番号 WO87/05937

⑲ 國際公開日 昭62(1987)10月8日

優先権主張 ⑩ 1986年3月24日 ⑩ 米国(US) 60843,349

⑩ 発明者 ピトラッチ、マイケル、アール。

アメリカ合衆国、コロラド 80303, ボウルダー、ウェスト ムーアヘッド サークル 4848

⑩ 発明者 ドハーティ、ダニエル、エイチ。

アメリカ合衆国、コロラド 80303, ボウルダー、イサカ ドライブ 719

⑩ 出願人 ゲティ サイエンティフィック デベロップメントカンパニー

アメリカ合衆国、テキサス 77215-0070, ヒューストン、ブライアーバーク 3901

⑩ 代理人 弁理士 青木 朗 外4名

⑩ 指定国 A T(広域特許), B E(広域特許), C H(広域特許), D E(広域特許), D K, F I, F R(広域特許), G B(広域特許), I T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域特許), N O, S E(広域特許), U S, U S

最終頁に続く

請求の範囲

1. 複スクレオチドの製造のための組換DNA法であって、(a)少なくとも1種類の複スクレオチドを生成するよう代替宿主微生物を指令することができる少なくとも1つのポータブルDNA配列を用意し：

(b)宿主微生物中に移行することができそしてその中で複製することができるベクターであって、前記ポータブルDNA配列によりコードされている生合成酵素の発現のための要素を含有するベクターの少なくとも一つに、該ポータブルDNA配列をクローニングし；

(c)前記ポータブルDNA配列を含有する前記ベクターを、該ポータブルDNA配列の指令のもとで少なくとも1種類の複スクレオチドを生成することができる宿主微生物中に移行せしめ；

(d)前記ベクターの維持及び前記複スクレオチドの合成のために適当な条件下で前記宿主微生物を培養し；そして場合によっては、

(e)前記複スクレオチドを採取する。ことを含んで成る方法。

2. 製造されるべき前記複スクレオチドがUDP-グルコースである請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 製造されるべき前記複スクレオチドがUDP-グルコン酸である請求の範囲第1項に記載の方法。

4. 製造されるべき前記複スクレオチドがCDP-マンノ

ースである請求の範囲第1項に記載の方法。

5. 前記ベクターがpAS7, pAS9及びpTS13から成る群から選択されたものである請求の範囲第1項に記載の方法。

6. 前記宿主が脱窒細菌である請求の範囲第1項に記載の方法。

7. 前記宿主がクロストリジウム (*Clostridium*) 属の細菌から選ばれたものである請求の範囲第1項に記載の方法。

8. 前記宿主がシュードモナス・ブチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・セバシア (*Pseudomonas capsacia*)、シュードモナス・デニトリフィカヌス (*Pseudomonas denitrificans*)、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナス・ストッフェリ (*Pseudomonas stutzeri*)、エッシャーリシヤ・コリ (*Escherichia coli*)、及びエンテロバクター・クロアカエ (*Enterobacter cloacae*)から成る群から選ばれたものである、請求の範囲第1項に記載の方法。

9. UDP-グルコース・ビロホスホリラーゼ、UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ、ホスホグルコムターゼ、ホスホマンノムターゼ及びCDP-マンノース・ビロホスホリラーゼから成る群から選ばれた酵素の少なくとも1種を合成するように微生物細胞を指令することができる少なくとも1種類のプラスミドを含んで成る製造物。

10. プラスミドpAS7。

11. プラスミドpAS9。

12. プラスミドpTS13。

13. UDP-グルコース、UDP-グルクロン酸及びGDP-マンノースから成る群から選ばれた1又は複数の糖スクリオチドの微生物的合成を指令することができるプラスミド。

14. X. カンペストリス (*X. campestris*) X872株の微生物。

15. E. コリ (*E. coli*) LE392(pAS7)株の微生物。

16. E. コリ (*E. coli*) LE392(pAS9)株の微生物。

17. E. コリ (*E. coli*) LE392(pTS13)株の微生物。

組換DNA法を用いる糖スクリオチドの合成方法

発明の背景

これに、1986年3月24日に出願された米国特許出願No 843,349号の一部複数出願である。

この発明は種々の糖スクリオチドの製造のための組換DNA法に関し、この構成は次に、やはり組換DNA法により微生物的に生産されるポリサッカライドに導入される。

ある種の微生物が工業的に有用な種々のポリサッカライドを生産することができることは古くから知られている。ポリサッカライドの合成に先立ち、これらの微生物はポリサッカライドを構成するための糖スクリオチド源を有さなければならぬ。キサンタンガムを生産することができる微生物であるキサントモナス・カンペストリス (*Xanthomonas campestris*)の場合、糖スクリオチドであるUDP-グルコース、GDP-マンノース及びUDP-グルクロン酸が合成経路における直接の前駆体のすべてであることが見出されている。すなわち、キサンタンガムの合成経路を説明するにあたり、本発明者等はX. カンペストリス (*X. campestris*)における糖スクリオチドの合成を担当するDNA配列を見出し、そしてキサントモナス (*Xanthomonas*) sp. 及びこれに代る宿主においてこれらの糖スクリオチドを生産するための組換DNA法を開発した。

キサンタンガムを天然に生産することができるキサントモナス等、において糖スクリオチドの生産を増加せしめるためのこれらの方針の開発は、これらの微生物によるこのポリサッカライドの生産の増加を可能にするはずである。これらの微生物中には検出することができるレベルの糖スクリオチド前駆体が存在するが、それらのレベルは低いことが見出された。さらに、ポリサッカライドの合成を担当する合成経路の部分に異常が存在するキサントモナス生物体中では、これらの糖スクリオチド前駆体の細胞内量が2~7倍増加することも注目された。従って、天然キサンタン生産における後段階は糖スクリオチド前駆体濃度であり、そして糖スクリオチド生産を指令することができる遺伝子のDNA配列の導入により細胞内糖スクリオチド濃度を上昇せしめることができると信じられる。

さらに、キサンタンガムの製造のための組換DNA法において使用するための代替宿主として望ましいと認められる幾つかの微生物は一般に、必要とされる糖スクリオチド前駆体を生産しないか、又はキサンタン生産を可能にするために効果的な量ではそれらを生産しないことが見出された。最近開示されているこの様な組換DNA法及び代替宿主の例は、1986年3月26日に出願された、「Recombinant DNA-Mediated Production of Xanthan Gum」と題するMichael A. Capage等の米国特許出願No 844,332号に記載されている。従って、これらの方針においては、キサンタン生合成遺伝子を発現させるのに加えて、必要とされる糖スクリオチド前駆体を生産する

よう代替宿主を試尋する必要がある。本発明は一部においてこの様な方法を提供する。

さらに、本発明の方針は、キサンタン以外のポリサッカライドに導入することが意図される場合に糖スクリオチド生産を誘導するための使用することができる。例えば、生合成前駆体として本発明の糖スクリオチドの幾つか又はすべてを必要とするキサンタンの変形体である他の種々のガムが同定されている。これらのガムには、1985年8月6日に出願された「A Polysaccharide Polymer Made by Xanthomonas」と題するVanderslice等の係属中の米国特許出願No 762,878号に記載されている。

さらに、ここに開示する糖スクリオチドの製造のための組換DNA法は、医薬薬剤としても関心が持たれるある種のポリサッカライドの製造のためにも使用されることが期待される。例えば、E. コリ (*E. coli*) により生産されるポリサッカライドコロン酸 (colonic acid) は、予防接種目的に有用な可能性ある抗原として期待される。コロン酸の生産は前駆体糖スクリオチドの増加した微生物的生産により開始され又は増強されると信じられる。

発現及び活性を調節する通常の制御機構は外来DNA又は酵素について有効でないから、他の微生物種へのDNA配列の導入はこれらの配列により指令される糖スクリオチドの生産を増強することもできるであろう。さらに、多くの抗生素質例えばストレプトマイセス (*Streptomyces*) の種により生産されるマクロライド抗生素質の一般的部類は糖スクリオ

チド前駆体に由来する糖成分を有する。糖スクレオチドを製造するための組換DNA法をこのような微生物に通用して微生物質の生合成のために必須の前駆体の利用を増強することができる。

発明の概要

この発明の1つの目的は、糖スクレオチドの組換DNA法による製造方法を提供することである。これらの糖スクレオチドは、種々のポリサッカライドのイン-ビボ合成において、特に、キサンタン及び1986年3月26日に出願された“Family of Xanthan-Based Polysaccharide Polymers Including Non-Acetylated and/or Non-Pyruvylated Gum and Acetylated or Non-Acetylated Polytetrasaccharide Gum”と題するDoherty等の米国特許出願No. 844,435中に十分に記載されている、キサンタンに構造的に関連する新規なポリサッカライドの合成において使用することができると思われる。

これらの糖スクレオチドの組換DNAによる合成を促進するため、本発明の他の目的是これらのポータブル配列を含有するベクターを提供することである。これらのベクターを組換系において使用して、微生物的に生産されるポリサッカライドを生成せしめるのに十分な量の糖スクレオチドを生産することができる。

この発明の追加の目的及び利点は一部に明細書に記載され、又はこの発明の実施によって知られるであろう。これらの目的及び利点は添付された請求の範囲において具体的に指摘さ

れる手段及び組合せにより実現され、そして達成されるであろう。

これらの目的を達成するため、そして本発明の目的に従って、糖スクレオチドの製造方法が記載される。この様な糖スクレオチドの糖成分は、1986年3月26日に出願された“Recombinant-DNA Mediated Production of Xanthan Gum”と題するCapage等の米国特許出願No. 844,332に記載されている方法及びベクターを用いて、キサンタンのごときポリサッカライドに導入されるであろう。

ポータブルDNA配列は合成配列でも制限断片（“天然”DNA配列）でもよい。好みの態様においては、ポータブルDNA配列はX. カンペストリスのライプラリーから導入され、そして代替宿主に移行される場合、少なくとも1種の糖スクレオチドの生産を指令することができる。

さらに、前記の目的を達成するため、そして本発明の目的に従って、前記のポータブルDNA配列を用いて、キサンタンガム及び他のゼリサッカライドを製造するために使用することができる糖スクレオチドの微生物的生産をもたらす組換DNA法が開示される。この組換DNA法は：

- a) 少なくとも1種類の糖スクレオチドを生産するように代替宿主微生物を指令することができる少なくとも1のポータブルDNA配列を調製し；
- b) 宿主微生物に移行することができそしてその内で複製することができるベクターであって、生合成酵素をコードする前記ポータブルDNA配列の発現のための因子を含有する

ベクターに該ポータブルDNA配列をクローニングし；

c) 前記ポータブルDNA配列の指令のもとで糖スクレオチド合成のための生合成酵素を生産することができる宿主微生物へ、該ポータブルDNA配列を含有する前記ベクターを移行せしめ；

d) 前記ベクターの種特及び前記糖スクレオチドの合成のために適当な条件下での前記宿主微生物を培養し；そして場合によつては、

e) 前記糖スクレオチドを採取する；
を含んで成る。

前記の目的をさらに達成するため、そして本発明の目的にさらに従って、前記のポータブルDNA配列の少なくとも1つをそれぞれが含有する一連のプラスミドが提供される。特に、プラスミドpAS7, pAS9及びpTS13が開示される。さらに、ホスホグルコムターゼを欠くX. カンペストリスの変異株X872が提供される。キサントモナス・カンペストリスX872株は、1986年3月21日に、American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Marylandに、受託番号No. 53471として寄託された。プラスミドpAS9を担持するE. coli LE392(pAS9)、プラスミドpAS7を担持するE. coli LE392(pAS7)、及びプラスミドpTS13を担持するE. coli LE392(pTS13)が、1986年3月21日に、それぞれNo. 67050, No. 67048、およびNo. 67047として寄託された。

前記の一般的記載及び以後の詳細な記載はいずれも單に例示しそして説明するためのものであって、請求の範囲のよう

にこの発明を限定するものではないと理解すべきである。添付図面は、この明細書に組み込まれそしてその一部を構成するものであつて、この発明の種々の具体例を例示し、そしてこの記載と相俟つてこの発明の原理を説明するために役立つものである。

図面の簡単な説明

第1図は、UDP-グルコース、UDP-グルクロン酸、及びGDP-マンノースの合成のための生合成経路を示すものである。

第2図は、複数混合物中のUDP-グルコース、GDP-マンノース、UDP-ガラクトュロン酸及びUDP-グルクロン酸の高速液体クロマトグラフィーによる分離を示す。各化合物について240~300nmの紫外線スペクトルが示されている。

第3図は、UDP-グルコース、UDP-グルクロン酸、及びUDP-ガラクトュロン酸を欠く変異株（クラス1）の代表であるX872株からの細胞抽出物のクロマトグラムを示す。柱目の領域において検出するピークのスペクトルが第2図のそれとの比較のために示される。

第4図は、GDP-マンノースを欠く変異株（クラス2）の代表であるX869株からの細胞抽出物のクロマトグラムを示す。柱目の領域において検出するピークのスペクトルが第2図のそれと比較するために示されている。

第5図は、UDP-グルクロン酸及びUDP-ガラクトュ

ロン故を欠く変異株（クラス3）の代表であるX871はからの細胞抽出物のクロマトグラムが示されている。注目の領域において溶出するピークのスペクトルが第2図中のそれと比較するために示されている。

第6図は、UDP-グルコース、GDP-マンノース、UDP-グルクロン酸及び UDP-ガラクチュロン酸を欠く変異株（クラス4）の代表であるX866はからの細胞抽出物のクロマトグラムを示す。注目の領域において溶出するピークのスペクトルが第2のそれと比較するために示されている。

第7図は、変異株X649（クラス1）における UDP-グルコース及び UDP-グルクロン酸の合成を防止する欠損を補完するプラスミドpTS13の造成の段階を示す。

第8図は、変異株X736（クラス3）における UDP-グルクロン酸の合成を防止する欠損を補完するプラスミドpAS9の造成の段階を示す。

第9図は、変異株X632（クラス4）における UDP-グルコース、GDP-マンノース及び UDP-グルクロン酸の合成を防止する欠損、並びに変異株X711及びX712（クラス2）における GDP-マンノースの合成を防止する欠損を補完するプラスミドpAS7の造成の段階を示す。

第10図は、バラコッカス・デニトリフィカンス (*Paracoccus denitrificans*) からの細胞抽出物のクロマトグラムを示し、UDP-グルコース及び GDP-マンノースは存在するがしかし UDP-グルクロン酸は存在しないことを示す。

第11図は、第10図に示したバラコッカス・デニトリフ

ィカンスの細胞抽出物中の UDP-グルコース及び他のクリジン含有化合物を確認するスペクトルを示す。

第12図は、第10図に示したバラコッカス・デニトリフィカンスの細胞抽出物中の GDP-マンノースの固定を確認するスペクトルを示し、そしてこの図中に観察される、後に溶出する化合物がアデノシン含有化合物であることを示す。

好みしい細菌の具体的な記載

この発明は一般に、組織DNA性を用いての、種々の糖スクレオチドの合成に関する。以下の具体的な記載は、例として、キサンタンガム及びその変形物の製造においても有用な UDP-グルコース、GDP-マンノース及び UDP-グルクロン酸の製造の記載を用いる。

糖スクレオチド UDP-グルコース、GDP-マンノース及び UDP-グルクロン酸はキサンタンガムのための生合成経路の直接前駆体である。Vanderslice等、前述、（引用によりこの明細書に組み入れる）により記載されているようにキサンタンのインピトロ生合成を指すためにはこれらの化合物のすべてが必要である。糖トランスフェラーゼの特異性のため、ADP-グルコースのごとき他の糖スクレオチドはキサンタンの前駆体として役立つことができない。X.カンペストリスでの前記3種類の必要な糖スクレオチドの合成経路が第1図に示されている。キサントモナス・カンペストリスは検出可能な程度の UDP-ガラクトースを有さず、従ってE.コリのごとき他の細菌において観察されるグルコ-

ース-1-ホスフェート-UDP-ガラクトース・ウリジル・トランスフェラーゼ反応は起こり得ない。

キサンタンガムをインピボ生産することができないX.カンペストリスの変異株 (Gum-1株) は、UDP-グルコース、GDP-マンノース及び UDP-グルクロン酸が供給された場合にキサンタンガムをインピトロ合成する細胞溶解物の能力に基いて2つのクラスに分けることができる。キサンタンをインピトロ生産することができない変異株はキサンタン生合成機構（糖トランスフェラーゼ及びポリメラーゼ）を欠いている。外来基質が供給された場合にキサンタンをインピトロ生産することができる変異株に必要な前駆体をインピボ生産する能力を欠いている。若干のこの第二のクラスの変異株には、グルコースの経道及びその代謝を欠損しているものが含まれ、この場合キサンタン合環の速度が非常に低い。下記の他のものは貿易酵素の正常な補充物を有するが1又に複数の糖スクレオチドそれ自体を合成するために必要な酵素を欠いている。

この様な変異株に、X.カンペストリスのトランスポゾン変異誘発の後にGum-コロニーを除い、そして添加された UDP-グルコース、GDP-マンノース及び UDP-グルクロン酸の存在下でキサンタンのインピトロ生合成を分析することにより得られた。特定の糖スクレオチド欠損は、糖スクレオチドを抽出しそして該抽出物を高速液体クロマトグラフィー法を用いて分析することによりインピボで固定された。4種類の変異株のクラスが固定された。これらには、1)

UDP-グルコース、UDP-グルクロン酸及びこれらの化合物に由来する他の糖スクレオチドの合成を欠くもの；2) GDP-マンノース及び関連化合物の合成を欠くもの；3) UDP-グルクロン酸及び関連化合物の合成を欠くが、しかし UDP-グルコースはそうでないもの；並びに4) UDP-グルコース、UDP-グルクロン酸、GDP-マンノース及び関連化合物の合成を欠くものが含まれる。UDP-グルコースの UDP-グルクロン酸への転換は一段階過程であるから、変異体クラス3は明らかに UDP-グルコースデニドロゲナーゼを欠いている。他の変異体クラスは糖スクレオチドの生合成に必要なインピトロ酵素活性の分析により特徴付けられた。

グルコース-6-ホスフェート及びスラクトース-6-ホスフェートは微生物代謝におけるキー中間体である。フラクトース-6-ホスフェートから UDP-N-アセチルグルコサミンへの経路はグラム陰性細菌及びグラム陽性細菌に共通である。UDP-N-アセチルグルコサミンは細胞壁中のペプチドグリカンの必須の前駆体である。第1図中に4及び12として示される2種類のビロホスホリラーゼは UDP-グルコース及び GDP-マンノースの生合成における責任ある段階 (committed steps) であり、他の生物体においてはグルコース-6-ホスフェートは他のスクレオチドトリホスフェートと反応して他の糖スクレオチド、例えば ADP-グルコース及び TDP-グルコースを生成することができる。 UDP-グルコース経路において、 UDP-グルコース・ビ

ロホスファターゼの遺伝子が例4に記載したようにして導入された。この遺伝子中の変異は、UDP-グルコースのみならずこれに由来する他の糖スクレオチド、すなわちUDP-グルクロン酸及びUDP-ガラクトュロン酸の合成を防止する。UDP-グルコース・デヒドロゲナーゼ（酵素S）の遺伝子も例5に記載するようにして導入された。この遺伝子における変異にはUDP-グルクロン酸及びこれに由来する他の糖スクレオチド、すなわちUDP-ガラクトュロン酸の合成を防止する。この様な極効果（polar effects）は次にX.カンペストリスにおけるキサンタン生合成のみならずリボポリサッカライド合成を破壊する。これはその工程のための糖スクレオチドの供給を破壊することによる。

さらに、GDP-マンノースの合成を欠損した変異株が見出された。これらの変異株はマンノース上で正常に増殖し、そしてそれ故に細胞中に共通に見出される酵素である酵素2、すなわちホスホマンノースイソメラーゼを有する。従って、これらは例9に記載するように酵素1と/or又は1'を欠損しているなければならない。交差ハイブリダイゼーションマッピング及び制限地図は、これらの変異がX.カンペストリスの染色体内の少なくとも別の2ヶ所に存在することを示す。これらの変異株中に挿入された場合にGDP-マンノースの合成を惹起するプラスミドが開発された。このプラスミドの詳細を例6に示す。さらに、このプラスミドには、ホスホグルコムターゼ（pgm）及びGDP-マンノースを生産することができない変異株のCym-欠損を補完する。この変異は

pgmの発現を調節するため前記遺伝子内にあるか、又はpgm構造遺伝子それ自体の中にあるであろう。

ホスホグルコムターゼのみを欠く他の変異株X872が見出された。この明確な記載する方法により、当業者は応用可能な科学の現状に照らして、この遺伝子の野性型コピーを保持するプラスミドを造成することができる。

すなわち、直接のキサンタン前駆体の合成のための遺伝子が本発明者等によって同定された。これらの遺伝子は、 UDP-グルコース、GDP-マンノース及びUDP-グルクロン酸の合成のために必要とされる酵素のための遺伝子を包含する。これらの酵素をコードする遺伝子の野性型コピーを含むプラスミドがメタバージ中に造成された遺伝子ライブラリーから得られた。トランスポゾンにより誘導された糖スクレオチド欠損変異株からの染色体DNAのクローニング化されたDNAセグメントを保持するベクターRSF1010から成る組換えプラスミドの³²P-ラベル化プラスミドDNAが同定された。该クローニング断片はトランスポゾン及び周辺（flanking）染色体DNAを含有する。この様な組換え体はCapage等、前記により記載されているように容易に単離することができる3種類の多コピー広宿主性プラスミドが下記の例中に一層詳細に記載される複雑的技術を用いて造成された。これらのプラスミドpTS13、pAS7及びpAS9は、それぞれ前記の変異クラス1、2、及び3の株を補完するDNAを含有する。さらにプラスミドpAS7にクラス4の変異株を補完する。これらのプラスミドのいずれも、キサンタン生合成遺伝子それ自体を含

む領域内の又はそれを挟むDNAと交差ハイブリダイズしない。メタバージの交差ハイブリダイゼーション、制限断片分析及び遺伝的補完により2個の異なる変異座がプラスミドpAS7中に同定された。これらのプラスミドの造成及び追加の情報が第7図～第9図に示され、そして後記の例において一層詳細に検討される。

各プラスミドに、適切な補完グループ中の変異株に挿入された場合、生ずるコロニーの粘質物の出現によって示されるように、キサンタンガムを生産する変異株の能力を回復せしめる。さらに、プラスミドが欠損した生合成能力を回復したことを確かめるために、補完された株からの抽出物中の糖スクレオチドが試験された。プラスミドpTS13はUDP-グルコース・ビロホスホリラーゼの遺伝子を保持している可能性が最も高い。なぜなら、変異株X649はUDP-グルコースを生産することができず、しかし野性型の量のホスホグルコムターゼを有するからである。さらに、プラスミドpTS13は、X649由來の変異株に挿入された場合、UDP-グルコース・ビロホスホリラーゼを生産する能力を付与する（例8）。この株はグルコース上で正常に増殖し、従って増殖のためのグルコースの利用におけるキサ中間体であるグルコース-6-ホスフェートの合成を欠損していない。

前記のごとく、細胞がキサンタンガムを合成するためには UDP-グルコース、GDP-マンノース及びUDP-グルクロン酸が絶対的に必須である。前駆体としてそれぞれアセチル-コエンザイムA及びホスホエノールビルピン酸を必要

とするアセチル化及びビルビル化によるキサンタンの修飾にガムのレオロジー特性に影響を与えるが、その生合成のためにアセチル化及びビルビル化は必須ではない。さらに、これら後者の前駆体はいずれも細胞代謝の必須成分である。 UDP-グルコース、GDP-マンノース及びUDP-グルクロン酸は彼らの細胞において共通の糖スクレオチドであるがしかしすべての細胞これらすべてを有するわけではなく、又はキサンタン合成を支持するのに十分な量でこれらを有するわけではない。X.カンペストリス以外の生物体におけるキサンタン生合成経路の発現は、糖スクレオチド前駆体がその様な代替宿主内で、好ましくはキサンタンガムの経済的生産を支持するのに十分な速度で、合成されることを必要とする。 UDP-グルクロン酸をほとんど又は全く有しない若干の代替宿主が同定された（例7）。高選でのキサンタン合成を得るためにには、この様な株にUDP-グルコース・デヒドロゲナーゼの遺伝子を保持するDNAを挿入することが必要であろう。

代替宿主中の糖スクレオチド生合成遺伝子の発現のための基本的要件はX.カンペストリスにおけるそれに類似している。必要な1又は複数の遺伝子が染色体への組み込み又はプラスミド上での挿入により安定に維持され得るような亞種でこれらが宿主に挿入されなければならない。遺伝子造成物は、宿主が適切なmRNAを合成しそしてそれを機能的蛋白質に翻訳し、それが好ましくは該新宿主中で相対的に安定であるようなものでなければならない。さらに、宿主は、糖スクレ

オチドそれ自体の合成のための基質及びコファクターを提供することができなければならない。

広宿主性を有する高コピー数プラスミド及び低コピー数プラスミドの両者が存在する。プラスミドへの適切な複ヌクレオチド生合成遺伝子の挿入はすでに起っている。プラスミドをE. コリからX. カンペストリスの変異株に移行せしめたのと同様な結果でこの様なプラスミドを代替宿主に導入するために形質転換(transformation)又は接合(conjugation)を用いることができる。これらの広宿主性プラスミドは一般にグラム陰性細菌に感染するであろう。所望により、X. カンペストリス遺伝子をグラム陽性細菌に移行せしめることができるシャトルベクターが存在する。プラスミドの挿入及び保持は標準的方法により確認することができる。

代替宿主中の遺伝子の発現は幾つかの方法でモニターすることができる。すなわち、遺伝子から転写されたmRNAをハイブリダイゼーションにより検出することができ、蛋白質自身をイムノアッセイ又は機能測定により検出することができ、そしてあらかじめ欠損していた複ヌクレオチドを確立されたクロマトグラフ法により同定することができる。又は幾つかのこれらの技法による分析が、所望により、発現を最適化するための遺伝子造作物の調整を可能にするはずである。

類似の外部環境、例えばpH及び温度が維持される場合にはそうであるが、代替宿主の細胞内環境はX. カンペストリスのそれにおそらく類似しているであろう。キサンタンの生合成は広い温度範囲、すなわち12°C~37°Cにおいて行わ

れるが、その速度は27°Cと37°Cの間において最高であることがインビボ研究から知られる。明らかに、複ヌクレオチド前駆体の合成を担当する酵素はこの範囲において機械的でなければならない。最初の分析は27°C~30°Cにおいて行われるであろう。

種々の宿主での特定の複ヌクレオチドの生産への本発明の技法の広範な適用は、この明細書に含まれる教示に従ってして当業による可能性の範囲内にあるものと理解すべきである。従って、下記の例は単に例示的なものであり、請求の範囲のごとく、この発明を限定するものではない。

例1

この例は、インビボにおいてGum-である種々のX. カンペストリス株において固定される特定の複ヌクレオチド欠損について検討する。

複ヌクレオチド合成が欠損している変異株の最初の収集物を、Capage等、崩壊、に記載されているようにして、トランスポゾン変異構造の後にインビボでキサンタンを生産することができない。X. カンペストリス株のから得た。幾つかのGum-株は、複ヌクレオチド UDP-グルコース、GDP-マンノース及び UDP-グルクロン酸が供給された場合にインビトロでキサンタンを生産することができた。これらの変異株は、キサンタンそれ自身の生合成を欠損しているのではなく、むしろ複ヌクレオチド合成を欠損していた。次に、これらの変異株が色示トルイジンブルーに対して感受性であることが見出された。他のGum-株をトルイジンブルー感

受性についてスクリーニングすることにより追加の複ヌクレオチド変異株が得られた。これらの株は、野性型X. カンペストリス及びキサンタンの生合成それ自身を欠損するGum-変異株を除く幾つかの毒性(virulence)ファージに対して耐性であることが証明された。

インビトロにおいてGum-であるがインビボにおいてGum-である株において特定の複ヌクレオチド欠損を同定するために次の方法が用いられた。各株からの単離されたコロニーを拾い上げ、そして125mLのエルレンマイヤーフラスコ中2%のグルコースを含むYM培地(酵母エキス3g、マルトエキス3.6g及Dペプトン3.6g/L)10mLに播種した。培養物を50°C、250rpmにて24時間、又は遅りが出るまでインキュベートした。5%の接種物をYM培地から炭素源としてグルコースを含有する改変PACE培地(5gのKH₂PO₄、3gのK₂HPO₄、0.2gのMgSO₄·7H₂O、0.53gの(NH₄)₂SO₄、0.006gのE₁B₁、0.006gのZnCl₂、0.003gのFeCl₃、6H₂O及び0.02gのCaCl₂／L)に移し、そして30°Cにて24時間増殖せしめた。培養物を遠心分離により収得し、PACE培地2回洗浄し、そして600nmでの吸光が100となるのに十分な容量のPACE中に再懸濁した。サンプル1.5mLを、濃度を20mMにするのに十分な量のグルコースを含む50mLのエルレンマイヤーフラスコに入れた。各サンプルを30°Cの水浴中で400rpmにて10分間インキュベートし、次に1mLを取り出し、そしてエッペンドルフ遠心チューブ中0.1mLの11N塩酸に加えた。このチューブにキャップを付し、内容

物を渦動振拌機中で5秒間混合し、次にチューブをドライアイス-アルコール浴中に入れた。すべてのサンプルを凍結した後、チューブをドライアイスから取り出し、室温にて解凍し、そして5分間遠心して細胞破片をペレット化した。上清を、あらかじめ冷却した15mLのコニカル遠心チューブに入れ、そしてドライアイス-アルコール浴中で凍結した。凍結したサンプルを液塗乾燥機に入れ、そして乾燥した。各チューブの内容物を、トリエチルアミン(アルドリッヂ)により、pH 6.3に調整された40mLリン酸から成るHPLC緩衝液0.2mLに溶解した。サンプルを0.45μmフィルターを通して通過してミクロサンプルバイアルに入れ、そして0.6mL×250μLのC18逆相イオン対カラムに注入することにより40°C、0.8mL/minの流速で分析した。同一の条件下で行われた標準と保持時間を比較することにより、そして注目の領域で浮出する化合物のスペクトルを試験することにより、複ヌクレオチドを同定した。

複ヌクレオチド変異株の4つのクラスを次の方法を用いて同定した。

(1) UDP-グルコース及び UDP-グルクロン酸を合成することができない変異株；

(2) GDP-マンノースを合成することができない変異株；

(3) UDP-グルコースを合成することができるが、しかし UDP-グルクロン酸を合成することができない変異株；及び

(4) UDP-グルコース、GDP-マンノース及びUDP-グルクロン酸を合成することができない変異株。

各変異株クラスの代表的なクロマトグラム及び標準的なスペクトルを第2図～第6図に示す。クラス1・3、及び4の変異株はまた、X. カンペストリスのリボポリサッカライド前駆体であるUDP-ガラクチュロン酸を合成しなかった。これらのデータに基づけば、X. カンペストリスはUDP-グルクロン酸から UDP-ガラクチュロン酸を合成しなければならない。

X. カンペストリスの野性型株からの抽出物はキサンタンの生合成のために必要なヌクレオチドのすべてを有していた。第1表に示すように、キサンタンの生合成経路それ自体に欠損を有するGum-変異株は、野性型細胞よりも高濃度の前駆体糖スクレオチドを有していた。

第1表

野性型X. カンペストリス及びキサンタン生合成酵素自体に欠損を有する変異株中の UDP-グルコース、GDP-マンノース及び UDP-グルクロン酸の相対量

	UDP- グルコース	GDP- マンノース	UDP- グルクロン酸
X. カンペストリスS4-L	1.0	1.0	1.0
X. カンペストリスX648	2.5	4.7	2.0
X. カンペストリスX655	3.5	5.4	1.9
X. カンペストリスX705	4.2	7.1	2.0

及び細胞破片を除去した。バストールビペットを用いて上清を注意深く除去し、次に 130,000×g の平均遠心力にて回転バケットローター中で遠心分離することにより細胞質西分と膜西分とに分離した。細胞質成分を含有する上清をデカントし、そして -70°C にて凍結した。各膜含有ベレットを 1.0 mM の NOPS NaCl₂ 混合液に再懸濁し、そしてやはり -70°C にて凍結した。ヌクレオチド合成のために必要な酵素は細胞質成分中に通常見出される。細胞膜からの細胞質成分の分離がNADPの還元と共に測定する酵素的測定を容易にする。NADPHオキシダーゼは酵素学酵素であり、そして除去又は不活性化されない限り、還元されたピリジンスクレオチド（この苦種が反応を進めるために使用される）を急速に酸化することができる。

各細胞質抽出物中の蛋白質濃度を、標準としてウシ血清アルブミンを用いて、Lowry等、J.Biol.Chem. 193:265-275 (1951) (引用により特にこの明細書に組み入れる) を用いて決定した。各抽出物中のグルコース-6-ホスフェート・デヒドロゲナーゼの活性は、グルコース-6-ホスフェートの6-ホスホグルコン酸への酸化中に生成する NADPHの苦種に基づく 340nmにおける吸光の増加を追跡することにより決定された。この酵素はX. カンペストリスによるグルコースの代謝におけるキー酵素であり、そして内部対照として役立つ。反応条件は第2表の脚注に記載する。

グルコース-6-ホスフェートを UDP-グルコースの直後の前駆体であるグルコース-1-ホスフェートに転換する

これらのデーターは、野性型培養物におけるキサンタン生合成の速度が前駆体糖スクレオチドの供給により制限されることを示している。

例2

この例は、ヌクレオチド合成を欠くX. カンペストリスのトランスポゾンにより誘導された変異株におけるホスホジルコムターゼ活性を記載する。

ヌクレオチド合成を欠くことがあらかじめ見出されているトランスポゾン変異株から細胞質西分及び膜西分を調製した。陽性対照として役立てるためにX. カンペストリスS4-(KRL 81459)の抽出物も調製した。培養物を、プレート上に単離されたコロニーから 1% のグルコースを含む YM 培地 5 ml に移し、そしてチューボローラー上で定期的に培養せしめた。1% のグルコースを含有する YT 培地 (8 g のトリプトン、5 g の酵母エキス及び 5 g の NaCl / l) 100 ml を収容する 500 ml フラスコ 2 本に 2 ml の培養物を接種し、そして 30°C のイリキュベーター 中 300 rpm の振とう機上に置いた。24 時間後、培養物と一緒にし、そして遠心分離した。細胞ベレットを 100 ml のリン酸緩衝液化堿液液 (pH 7.2) 中で 2 回洗浄し、次に 1.0 mM NaCl₂ を含有する 5.0 mM NOPS 緩衝液 (pH 7.2) 中に 2.0 ml / v % となるように再懸濁した。細胞から残留培地を除去するためにこの方法を用いた。15,000 rpm にてフレンチアレスを 2 回通すことによって懸濁細胞を破砕した。細胞液解剖を DNA アーゼで処理することにより粘度を低下せしめ、次に 2,500 × g にて遠心分離して未破裂細胞

ホスホグルコムターゼも細胞質西分において測定した。ムターゼ活性は可逆的であるため、基質としてグルコース-1-ホスフェートを用いた。さらに、シグマ・ケミカルネエから購入した精製されたグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼを反応混合物に過剰に加えた。NADPHの形成速度が反応体系中に存在するホスホグルコムターゼによりグルコース-6-ホスフェートが生成する速度を示すものである。反応条件及びアッセイの結果を第2表に要約する。

X. カンペストリスのトランスポゾン-誘導型スクレオチド変異株の細胞質抽出物中のグルコース-6-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ (G6PD) 及びホスホグルコムターゼ (PGM) 活性。酵素活性は nmol / 分 / mg 蛋白質として示す。

菌株	UDP-グルコース-マンノース	GDP-グルクロン酸	UDP-グルクロン酸	G6PD ^(a)	PGM ^(b)
X4-L	+	-	+	268	238
X649	-	+	+	182	411
X652	-	-	-	255	2
X711	+	-	+	144	191
X712	+	-	+	154	223
X736	+	+	-	184	496
X826	+	+	-	154	276
X871	+	-	-	97	348
X828	-	-	-	148	7
X866	-	-	-	151	1
X869	+	-	+	163	535
X872 ^(c)	-	-	-	104	2

(a) 0.05 mg の細胞質蛋白質 (約 1.0 mg / mg の蛋白質) を添加することにより反応を開始した。反応混合物は 4 mM Tris-HCl (pH 8.6)、5 mM グルコース-6-ホスフェート、1.6 mM NADP 及び 1.5 mM G6PDH を 1.0 ml の合計容量中に含有した。

同様に、X652 はホスホグルコムターゼ活性をほとんど又は全く有しない。GDP-マンノース合成のみに欠損を有する変異株 - X657, X711, X712 及び X869 株 - は、正常なホスホグルコムターゼ活性を有する。X736, X826 及び X871 株は UDP-グルクロン酸を生産することができない。これらも正常なホスホグルコムターゼ活性を有する。

§3.

この例に、Ta10 で誘導された変異株中の糖スクレオチド欠損のマッピングの方法を記述する。

糖スクレオチド代謝に欠損を有する Ta10-誘導変異株のすべてについて、各変異株からの Ta10+ 周辺 (flanking) 染色体配列をクローニングすることによりプラスミドプローブを得た。エバントをアローピングすることにより、各プローブにハイブリダイズするがしかし X. カンペストリスの野性型 DNA のセグメントを担持するノックアウトを得た。これらのファージをブラーク精製し、そしてこれを用いて、Ta10 及び周辺 (flanking) DNA を含有するプラスミドプローブへの交差ハイブリダイズにより糖スクレオチド変異をマッピングした。

いずれの糖スクレオチドプローブも、キサンタン生合成経路それ自体の遺伝子を含むする DNA 領域内にマップしなかった。変異株 X649 について野性型 DNA を含有するファージは他の糖スクレオチドプローブのいずれともハイブリダイズしなかった。同様に、変異株 X736 DNA 中の Ta10挿入領域からの野性型 DNA を含有するファージは他の糖スクレオチドプローブにハイブリダイズしなかった。従って、これらの株中

(b) 反応条件は G6PD の場合と同様であるが、グルコース-6-ホスフェートの代りにグルコース-1-ホスフェートを使用した。反応混合物はさらに 1 mM チオスレイトール、0.2 mM グルコース-1, 6-ジホスフェート、及びシグマ・ケミカル社製の 1.0 ユニットの G6PD を含有した。

(c) ATCC No. 53471 として寄託されている。

すべての抽出物は 97~268 nmol / 分 / mg 蛋白質の範囲の有意な活性のグルコース-6-ホスフェート・デヒドロゲナーゼを有していた。 UDP-グルコースを合成することができる変異株から調製されたすべての抽出物において、ホスホグルコムターゼ活性は 191 nmol / 分 / mg 蛋白質以上であった。 UDP-グルコースを合成することができない、X649以外のすべての変異株 (X828, X652, X866、及び X872) からの抽出物にはほとんど又は全くホスホグルコムターゼ活性を有しなかった。この様な欠損は UDP-グルコースの合成を防止するために十分である。

X649 株は糖スクレオチドの UDP-グルコース系統を生産することができない。表現形質的には、これは Ta903 変異株である X872 株に類似する。しかしながら、X649 は正常のホスホグルコムターゼ活性を有するが、X872 はこの酵素を欠損している。X649 は UDP-グルコース・ビロホスホリラーゼそれ自身に欠損を有するに違いない。

X652 株は糖スクレオチドの UDP-グルコース系統及び GDP-マンノース 系統を生産することができない。これらの糖スクレオチドを欠く Ta903 変異株である X828 及び X866 と

の欠損遺伝子は他の糖スクレオチド遺伝子にリンクしていない。

プラスミド pTX652, pTX657, pTX711 及び pTX712 は、クローニングされた X. カンペストリス DNA を含有する組換えファージのオーバーラップするセットにハイブリダイズした。プラスミド pTX711 は、pTX652, pTX657 及び pTX712 にハイブリダイズするファージのすべてではないが幾つかにハイブリダイズした。

X632 はまた UDP-グルコース 又は UDP-グルクロン酸を生産することができないから、X652 株中の変異と GDP-マンノース の合成を防ぐ変異との関連は予想外であった。X652 中の変異は UDP-グルコース 及び GDP-マンノース の合成に影響を与えるトランスクレオチド (transacting) 制御遺伝子中に、又は UDP-グルコース 合成のために必須の酵素をコードするがしかし GDP-マンノース 遺伝子の発現に対する効果 (polar effect) を発揮する構造遺伝子中に存在するのであろう。

§4.

この例は、プラスミド pTS13 による X649 株中の変異の補充を説明する。

すべての糖スクレオチド変異株をトランスポゾン変異誘発により得た。X. カンペストリスのゲノム DNA のメライブラーーを、UDP-グルコース 及び UDP-グルクロン酸の合成に欠損を有する変異株 X649 からのトランスポゾン Ta10+ 周辺 (flanking) 染色体配列をクローニングする (Capage 等、前

尾、に記載されているようにして）ことにより誘導されたプラスミドpIX649を用いてプローブした。pIX649プローブにハイブリダイズするノ組換体10個が同定された。

各ノクローンのDNAについて制限消化及びゲル電気泳動を行った。これらの消化パターンにおいて、X649株中では変異しているX.カンペストリスDNAの野性型断片が同定された。この6.5kb PstI断片を分取用アガロースゲルからの電気溶出により精製した。このPstI断片をpBR322のPstI部位にクローニングしてプラスミドpT16.5を作った。pT16.5及びプラスミドRSF1010をEcoR Iで消化し、そして両プラスミドを一緒に連結することにより他のプラスミドを造成した。形質転換後にE.コリにストレプトマイシン耐性及びテトラサイクリン耐性を付与する能力によりハイブリドプラスミドを選択した。このキメラプラスミドpT.13は6.5kb PstI断片を含有する（第7図）。

次に、このプラスミドを、pRK2013により指合されるトリパレント・コンジュガル・トランスファー(triparental conjugational transfer)によりX.カンペストリスX649株に移行せしめた。

pT13により提供されたクローン化6.5kb断片は変異株X649を補完する。X649への移行のためのpT13のメイティング(mating)混合物をR11及びStrep上にプレートした場合、コロニーのすべてがGum+であり、そして野性型と区別することができなかった。3個のGum+キシソ接合体(exo-conjugate)を分析し、そしてこれらがプラスミドを含有する。

P-グルコースを生産する能力を付与することができる。

例3

この例は、プラスミドpAS9によるX736株中の変異の補完を説明する。

X736中Tn10挿入の領域からのX.カンペストリス染色体DNAを含有する5個のノファージ1種を単離した。

これらのファージは、プラスミドpIX736にハイブリダイズする組換体ファージについてスクリーニングすることによりノバウチ遺伝子から単離された。プラスミドpIX736は、変異表現型を生じさせたTn10挿入を含む変異株X736からの染色体DNAのPstI断片がプラスミドベクターRSF1010にクローニングされて居る。

これらのA736(-)ファージをオザンプロットハイブリダイゼーションによりスクリーニングして、注目の野性型PstI断片を含有する比較的大きなDNA断片を同定した。ノ組換体からのDNAを幾つかの制限エンドスクレアーゼにより消化し、そして同じセットの酵素で切断された野性型染色体DNAの対照と共にアガロースゲル上を泳動せしめた。次に、この消化物を、放射性ラベルされたpIX736プラスミドDNAによりプローブした。幾つかの異なるA736(+)单離体のSacI消化物がこのプローブとハイブリダイズする9kbの断片をもたらした。野性型染色体DNAのSacI消化物もこのプローブにアニュールする9kbのバンドを生成した。A736組換体には比較的小数のSacI断片を生成したので、ノからpHW79へショットガンクローニングを行った。プラスミドベクター

ことが示された。さらに、プラスミド・キュアー(curing)実験を行った。この実験においては、X649(pTS13)を、プラスミドの喪失を促進する条件で増殖せしめ、そして次にプラスミドを選択するであろういかなる薬剤も存在しない状態でプレートした。幾つかの実験において、これらのプレート中に有意な頻度(10-50%)でGum+コロニーが観察された。この様なGum+單離体3個を試験し、プラスミドpTS13が失われていることが示された。しかしながら、この実験からのGum+單離3個はすべてpTS13を保持していることが見出された。プラスミドの存在とGum+表現型との間の相関関係は、最初のGum+の性質が組換によるものではなく、むしろプラスミドに保持された遺伝子の発現によるものであることを主張している。

X649株及びpTS13を含有するX649株から抽出物を調製した。プラスミドを有するX649からの抽出物は、スペクトル分析及び保持時間により決定する場合、UDP-グルコースを有していた。X649のみからの抽出物はそうではなかった。

X649からの抽出物は正常な量のホスホグルコムターゼを有する(例1)から、UDP-グルコースの合成を防止する酵素の欠損はUDP-グルコース・ビロホスホリラーゼをコードする遺伝子中に位置しなければならない。この遺伝子はプラスミドpTS13中に含まれている。このプラスミドはRSF1010のキメラであるから、X.カンペストリス以外のグラム陰性細菌に移行することができ、そして該細菌がグルコース-1-ホスフェートを生成する能力を有するならば、それにUD

pHW79は、テトラサイクリン耐性遺伝子内に位置するユニクSalI部位を含有する。従って、pHW79及びA736(+)DNAの両者をSalIにより消化し、そして消化生成物と一緒に連結した。連結反応物を用いてE.コリを形質転換し、アンビシリシン耐性形質転換体を選択し、そしてそれらの650個をテトラサイクリンに対する感受性について試験して組換体プラスミドを同定した。10個の λ ap' tet'单離体が見出された。プラスミドDNAをこれらの形質転換体から抽出し、そして制限エンドスクレアーゼ消化及びアガロースゲル電気泳動により分析した。注目の組換体が見出された。クローニングされた9kbSalI断片を含有することプラスミドをpAS9と命名した(第8図)。

X736 Gum-欠損の補完を求めて、このプラスミドをX.カンペストリスに移行せしめた。プラスミドpAS9をX736のリファンビシリシン耐性菌株(X1017と称する)及びR11'野性型(Gum+)株X77に動員(mobilize)した。これらの動員は、pRK2013によって指合される標準的トリパレント・コンジュガル・トランスファー(triparental conjugational transfer)により行った。リファンビシリシン(E.コリ供与体及び動員菌(mobilizer strain)に対して選択するため)及びストレプトマイシン(pAS9の存在について選択するため)上にプレートすることにより、注目のプラスミドを保持するX.カンペストリス接合体(conjugant)を選択した。X1017へのpAS9のメイティング(mating)のR11'及びStrep'子孫はもっぱらGum+であった。3個のGum+单離体を選択し、そして

プラスミドについて選択した。3個すべてが明らかにプラスミドpAS9を含有していること、及び制限エンドヌクレアーゼ消化により決定する場合このプラスミドはなんらの明瞭な転換(rearrangement)を受けていないことが見出された。さらに、プラスミド⁺化(curing)実験を行った。この実験においては、X1017(pAS9)をプラスミドの喪失を促進する条件下で増殖せしめ、そして次にプラスミドを選択するであろういかなる要因も存在しない状態でプレートした。このプレート中で、有意な頻度でGum⁺コロニーが観察された。このようなGum⁺単離体3個を試験し、そしてプラスミドpAS9が失われていることが見出された。しかしながら、この実験からの3個のGum⁺単離はすべてpAS9を維持していることが見出された。プラスミドの存在とGum⁺表現型との間の相関関係は、Gum⁺の性質が組換によるものではなくむしろプラスミドに保持された遺伝子の発現によるものであることを主張している。

変異株X736はUDP-グルコースを生産することができるがしかし UDP-グルクロン酸を生産することができないから、UDP-グルコースの UDP-グルクロン酸への転換を担当する唯一の酵素 UDP-グルコース・デヒドロゲナーゼが欠損している可能性が最も高い。この酵素のための遺伝子はプラスミドpAS9上に含まれる。

例6.

この例はプラスミドpAST7によるX652、X711及びX712株中の変異の補充を説明する。

X652からのX1043の異なる抗生物質耐性が、これに続くE.コリ供与体に対する逆の選択を促進した。プラスミドpAST7の移行の後、X1043はGum⁺表現型に回復した。菌株がpAST7を失った場合この表現型はGum⁻に復帰し、Gum⁺表現型はX652株中でトランスポゾン挿入により不活性化された染色体DNAのプラスミドにより保持されたコピーの発現によるものであることが示された。

例3において示したように、X652、X711及びX712株中の変異はX.カンペストリス染色体上に隣がっている。プラスミドpAST7は、トリバレンタルメチオンゲルにおける接着による変異株X711及びX712への移行の後、Gum⁺表現型を回復した。補充された後はプラスミドを失った場合Gum⁻になつた。

X711及びX712株はX652株と同様にGDP-マンノースを合成することができない。プラスミドpAST7はこの能力を回復せしめ、そしてそれ故にGDP-マンノースの合成に必要な酵素をコードする遺伝子を含有している。

X652はまたUDP-グルコースの欠損を有する。この欠損はX652株におけるホスホグルコムターゼの欠失(例2)と一致する。GDP-マンノース合成に必要な酵素をコードする遺伝子を含有する同じリンケージがホスホグルコムターゼの構造遺伝子又はホスホグルコムターゼの発現を調節する制御遺伝子をも含有する。

例7.

この例は代替宿主における複数の変異株を説明す

複数の変異株X652からのトランスポゾンTe101+周辺(Flanking)染色体配列をプラスミドpSP1010にクローニングすることによって挑戦されたプラスミドpTX652により、X.カンペストリスのゲノムDNAのライブラリーをアーピングした。変異株X652はUDP-グルコース、GDP-マンノース又はUDP-グルクロン酸を生産しない。pTX652にハイブリダイズする組換えファージをアーラーク精製した。pTX652によりアーピングされたこれらのファージの制限消化物のサザンプロットに、トランスポゾン挿入の部位に対応する野性配列を含むする9kb BaeH I断片を同定した。

この9kb BaeH I断片を精製し、そしてプラスミドpM79のBaeH I部位に連結した。連結混合物を用いてE.コリを形質転換し、そしてアンビシリソ耐性形質転換体を選択した。これらをテトラサイクリン感受性についてスクリーニングした。pM79のBaeH I部位への外来DNAの挿入によりテトラサイクリンに対する耐性をコードする遺伝子が不活性化されるであろう。9kb BaeH I断片を含むするプラスミドpASTをこの方法により得た(第9図)。

次に、pRK2013により指合されるトリバレンタル・コンジュガル・トランスファーにより、プラスミドをE.コリからX.カンペストリスX1043に移した。pTX652をX.カンペストリス株X77(X.カンペストリスNRRL-B1459 S4-Lから得られたりファンビシン耐性変異株)にマイティングし、そしてテトラサイクリン選択を課すことによって相同性組換えを行わせることによりX.カンペストリスX1043が得られた。

る。

バラコッカス・デニトリフィカヌス(*Paracoccus denitrificans*)(ATCC 17741)、シュードモナス・ストッフェリ(*Pseudomonas stutzeri*)(ATCC 17588)、及びシュードモナス・バーフェクトマリナ(*Pseudomonas perfectomarina*)(ATCC 14405)中の複数の変異株を、X.カンペストリスのために開発された方法を用いて分離した。すべての生物を、炭素源として2%グルコースを用いて12時間培養せしめた。細胞を集め、洗浄し、そして600nmにおける吸光が100となる様に再溶解した。この細胞ペレットは、嫌気的培養のために要求されるチトクロームの合成を抑制解除した脱窒培養に典型的なピンク色を有していた(培養中の酸素制限に典型的な反応)。次に、2.5mM硝酸塩を追加の電子受容体としてインキュベーション混合物に含めた。細胞懸濁液を2.0mMグルコースと共に、硝酸塩を伴って又は伴わないで5分間インキュベートし、そして例1に記載したようにして培養により抽出した。抽出物を液槽乾燥し、TEA-リシン緩衝液中に溶解し、そしてHPLCにより分析した。柱の領域中のピークのスペクトルにより確認する場合、バラコッカス・デニトリフィカヌスはUDP-グルコース及びGDP-マンノースを有していたが、UDP-グルクロン酸の量は検出不能であった(第10~12図)。同様に、シュードモナス・バーフェクトマリナ及びシュードモナス・ストッフェリはUDP-グルコース及びGDP-マンノースを有していた。いずれの生物からの抽出物中にもUDP-グルクロン酸は検出されなかった。

例うにおいて記載したようにして、トリバレンタル・マイティングにおいて接合により、プラスミドpTS13をE.コリ供与体からこれら3種類の細胞のすべてに挿入して、UDP-グルクロン酸を合成することができるようこれらの株を修正することが意図される。

例2

この例は、糖ヌクレオチド合成に欠損を有するX.カンペストリスのトランスポゾン供与変異株におけるUDP-グルコース・ビロホスホリラーゼ活性を記載する。

X649株は UDP-グルコースを生成することができなかつた(例1)が、しかしほスホグルコムターゼ活性を有していた(例2)。下記の実験は、この株中の変異が UDP-グルコース・ビロホスホリラーゼ活性に影響を与えること、及び UDP-グルコース・ビロホスホリラーゼの遺伝子がプラスミドpTS13上に含まれることを示す。

UDP-グルコース・ビロホスホリラーゼ活性の分析を容易にするため、X649株のTn10挿入を担持するストレプトマイシン感受性リファンビシン耐性株3個を造成した。1つのこのような株X1023は、Capage等、前掲、により記載されている遺伝子置換法により造成された。他の2個の株X1024及びX1025は染色体動員(mobilization)により造成された。X649(例4)の糖ヌクレオチド欠損を補充するプラスミドpTS13を X1023,X1024及びX1025に挿入して、それぞれX1041,X1039及びX1040を得た。さらに、プラスミドpTS13をGum-リファンビシン耐性株X77に挿入してX1052株を生じさせた。

コース・ビロホスホリラーゼ遺伝子を担持していることを示すものである。

pTS13が UDP-グルコース・ビロホスホリラーゼ遺伝子を有することを確認するため、電子受容体としてNADPを用いて他の変異株により追加の実験を行った。結果を第3表に要約する。異なる抽出物濃度における多數の測定の結果が示される。

第1表

X.カンペストリスの細胞質画分中の UDP-グルコース・ビロホスホリラーゼ活性(10分間、蛋白質量当たり生成する NADPH₂の量 nmol)として表示。

菌株	UDP-グルコース・ビロホスホリラーゼ
X77	6.74, 3.46, 3.18
X1023	1.83
X1024	1.12
X1025	0.57
X1040	23.0, 8.83
X1041	41.1, 45.9, 42.6, 39.3
X1052	40.3, 42.1, 43.8

X1023,X1024及びX1025株はビロホスホリラーゼ活性をほとんど有しなかった。X1025及びX1023株中の欠損を補完するプラスミドを有するX1040及びX1041株は高い

これらの株、及び陽性対照として設立したX.カンペストリスX77から例2に記載したようにして細胞質画分を調製した。 UDP-グルコース・ビロホスホリラーゼビグルコース-1-ホスフェートとUTPとを UDP-グルコースとビロホスフェートとに転換する。これは反応は可逆的である。 Lieberman等、Proc.Natl.Acad.Sci. USA 65: 625-632(1970)(引用によりこの明記書に組み入れる)により記載されているようにして、ホスホグルコムターゼ及びグルコース-6-ホスフェート・デヒドロゲナーゼの添加によりNAD又はNADPの還元に UDP-グルコースからのグルコース-1-ホスフェートの形成をカップリングすることにより UDP-グルコース・ビロホスホリラーゼ活性を測定した。これらの測定においては、Tris緩衝液の代りに Hepes緩衝液を使用し、そして反応混合物からリン酸ナトリウムを省略した。堿化ナトリウム(5 mM)を添加してビロホスファターゼ活性を阻害した。

NADを用いる実験において、X1023株は5.4nmol/mg蛋白質/分の UDP-グルコース・ビロホスホリラーゼ活性を有しており、これは、野性型株X77の UDP-グルコース・ビロホスホリラーゼ活性 72.2nmol/mg蛋白質/分の10%未満であった。X1023反応混合物における340nmの吸光の増加のはんどすべてが UDP-グルコース・ビロホスホリラーゼ活性それ自体によるものではなく競争反応によるものであった。X1039株は 18.7nmol/mg蛋白質/分の UDPGビロホスホリラーゼ活性を有しており、X1023における活性よりも高かった。この結果は、プラスミドpTS13が UDP-グル

活性を有していた。同様に、X1052にプラスミドpTS13を含むしない野性型親株X77より非常に高い活性を有していた。pTS13は高コピー数プラスミドであるプラスミドRSF1010に由来するから、この活性の差異は遺伝子量効果を反映したものであろう。X77及びX1040株の細胞質抽出物を再度調製し、今回も恒温サンプルコンパートメントを装着した分光光度計中でビロホスホリラーゼ活性を直接測定した。比活性は、X77及びX1040についてそれぞれ 149及び 53.4nmol/mg蛋白質/分であった。

これらの結果は、X649中の変異が UDP-グルコース・ビロホスホリラーゼ活性の除去により UDP-グルコースの合成を防止することを確認するものである。この活性は、 UDP-グルコース・ビロホスホリラーゼの遺伝子を担持しているに違いないプラスミドpTS13により回復され得る。

UDP-グルコース・ビロホスホリラーゼ活性をさらに、 T903シリーズの糖ヌクレオチド変異株からの細胞質抽出物中で測定した。反応混合物は NaFを含有しなかった。結果を第4表に示す。

第4表

ホスホグルコムターゼ (PCM) 活性があらかじめ測定された Tn903細胞スクリオチド変異株の抽出物中の UDP-グルコース・ビロホスホリラーゼ活性 (UDPG-PPアーゼ:nmol / 分 / mg 蛋白質)

菌株	欠失糖スクリオチド	UDPG-PPアーゼ
X77		9.4
X826	UDP-GlcA	10.5
X871	UDP-GlcA	31.1
X828	UDP-Glc, UDP-GlcA, GDP-aa	28.5
X866	UDP-Glc, UDP-GlcA, GDP-aa	17.3
X869	GDP-aa	5.88
X872	UDP-Glc, UDP-GlcA	86.2

すべての株が測定可能なビロホスホリラーゼ活性を有していた。ホスホグルコムターゼ活性の不存在は、X828, X866及びX872株が UDP-グルコースを合成することができないことを説明するのに十分である。

例9

この例は糖スクリオチド合成に欠損を有する、X. カンペストリスのトランスポゾン-誘導変異株におけるホスホマンノムターゼ活性を記載する。

あらかじめ同定された糖スクリオチド変異株 (例1) からの細胞質抽出物を例2に記載したようにして調整した。マン

(2000ユニット/m) 及び0.05mのG6PD (1000ユニット/m) の混合物から、1ユニットは1分間に 1.0 nmole の基質を生成物に転換する量。

反応速度は数分間後に直線的になる。この時間はリン酸化された糖中間体が定量濃度に達するためには必要な時間である。これらの直線的速度は反応混合物に含められた細胞質抽出物の量に比例する。便宜上、実際の反応速度を決定するのではなく、マンノース-1-ホスフェートの存在下でのNADPH₄O₂生成と非存在下でのそれを30分間のインキュベーションの後に比較することにより GMM活性を決定した。結果を第6表に要約する。

ノース-6-ホスフェートを GDP-マンノース・ビロホスホリラーゼの基質であるマンノース-1-ホスフェートに転換する酵素であるホスホマンノムターゼ (PMM) について、これらの抽出物を測定した。酵素反応は可逆的である。

測定 (第5表) はPinder及びBocke, Biochem.J. 152: 617-622(1975) (引用によりこの明記書に組み入れる) の方法から改変したものであり、この方法においては酵素ホスホマンノース・イソメラーゼ (PMI) 、ホスホグルコースイソメラーゼ (PGI) 及びグルコース-6-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ (G6PD) の添加により、マンノース-6-ホスフェートの生成がNADPの還元にカップリングされる。

第5表

キサントモナス・カンペストリスにおけるホスホマンノムターゼ活性の測定のための反応混合物

濃	濃	濃
10 mM NADP		0.10
10 mM マンノース-1-ホスフェート		0.10
1 mM グルコース-1, 6-ジホスフェート		0.02
カップリング酵素 ¹¹⁾		0.02
100 mM システイン HCl		0.05
100 mM BEPES 缓衝液 (pH 7.9)		0.50
水及び抽出物		0.21

¹¹⁾ 0.10mのPMI (380ユニット/m) 、0.05mのPGI

第6表

GDP-マンノースを合成することができない糖スクリオチド変異株の細胞質抽出物中のホスホマンノムターゼ活性。マンノース-1-ホスフェート (MIP) を伴わないか又は伴う30分間のインキュベーションの後に 340nmにおける吸光を測定した。

菌株	糖スクリオチド欠損	340nmにおける吸光のMIPに依存する増加
652	GDPMan, UDPGlc, UDPGlcA	有り
711	GDPMan	有り
712	GDPMan	有り
828	GDPMan, UDPGlc, UDPGlcA	有り
866	GDPMan, UDPGlc, UDPGlcA	無し
869	GDPMan	有り

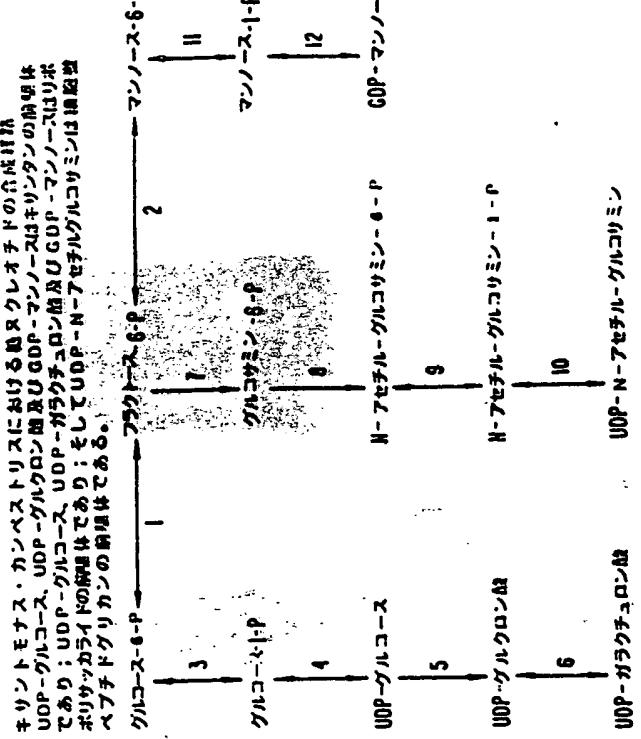
最初にX865抽出物がマンノース-1-ホスフェートの添加後に 340nmにおける吸光の増加を示した。しかしながら、この増加をホスホマンノムターゼ活性に帰することはできなかった。反応速度は直線的ではなく、得られるべき最大吸光よりもかに下方で平らになった。X866の抽出物に、グルコース-6-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ活性について測定した際のお活性であった (0.77 nmol / m / 分)。X866株は明らかにPMM活性を欠損している。

他のすべてのGDP-マンノース変異株はホスホマンノムターゼ活性を有していた。これらの変異株においてGDP-

マンノースの合成を防止する欠損酵素はGDP-マンノース・ビロホスホリラーゼでなければならない。GDP-マンノースの合成を防止する、X632, X711及びX712中の欠損はプラスミドpASTによって修正されるから、このプラスミドはGDP-マンノース・ビロホスホリラーゼの遺伝子を保持しているに違いない。

この発明の方法及び生成物において種の変更を行うことができるところが当業者には明らかであろう。従って、添付された請求の範囲及びその均等の範囲に入る限り、この発明の変更是この発明に属することが意図される。

F/G.1.



略語：

1. グルコースホスフュート・イソメラーゼ
2. マンノースホスフュート・イソメラーゼ
3. ホスホグルコムターゼ
4. UDP-グルコース・ビロホスホリラーゼ
5. UDP-グルコース・ヒドロゲナーゼ
6. UDP-ガラクトナーゼ
7. グルコサミンホスフュート・イソメラーゼ
8. グルコサミンホスフュート・アセチルトランスフェラーゼ
9. アセチルグルコサミンホスホムターゼ
10. UDP-グルコサミン・ビロホスホリラーゼ
11. ホスホマンノース・ヒドロゲナーゼ
12. GDP-マンノース・ビロホスホリラーゼ

FILE: STOSMARS'S
DATE: 03/05/1985

hp 1040A

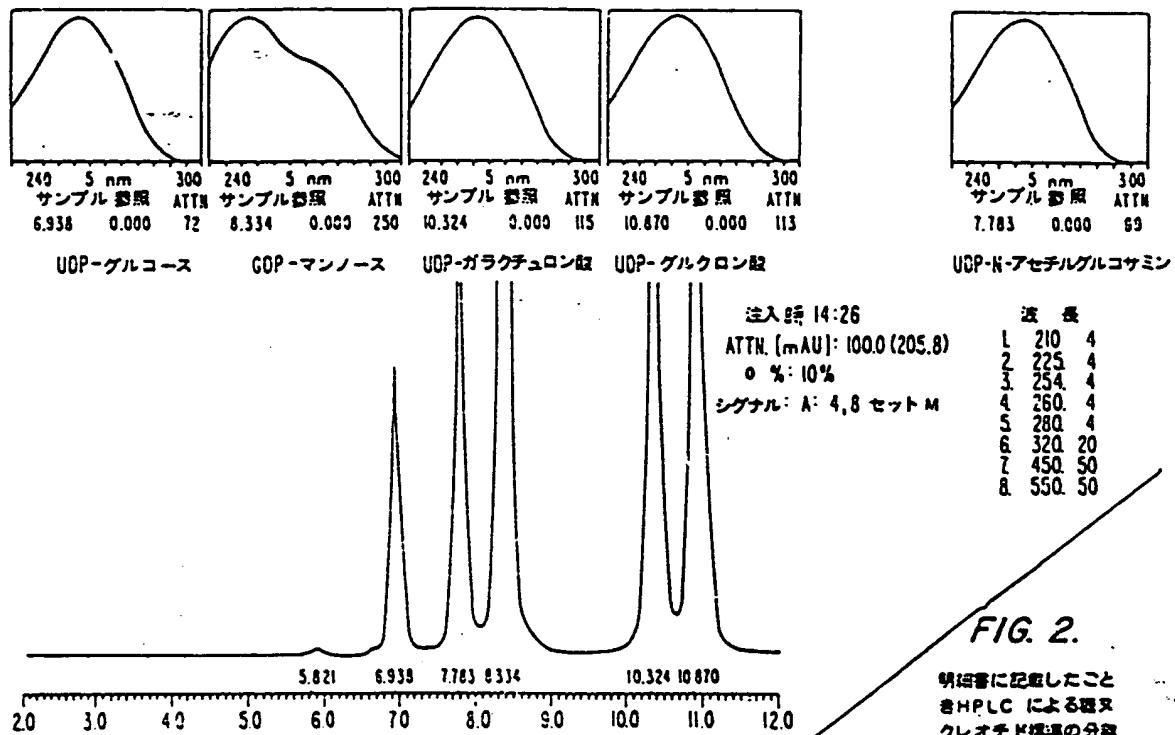


FIG. 2.
明確に記載したこと
きHPLCによる選又
クレオチド標準の分離

FILE: X872MARS'S
DATE: 03/05/1985

hp 1040A

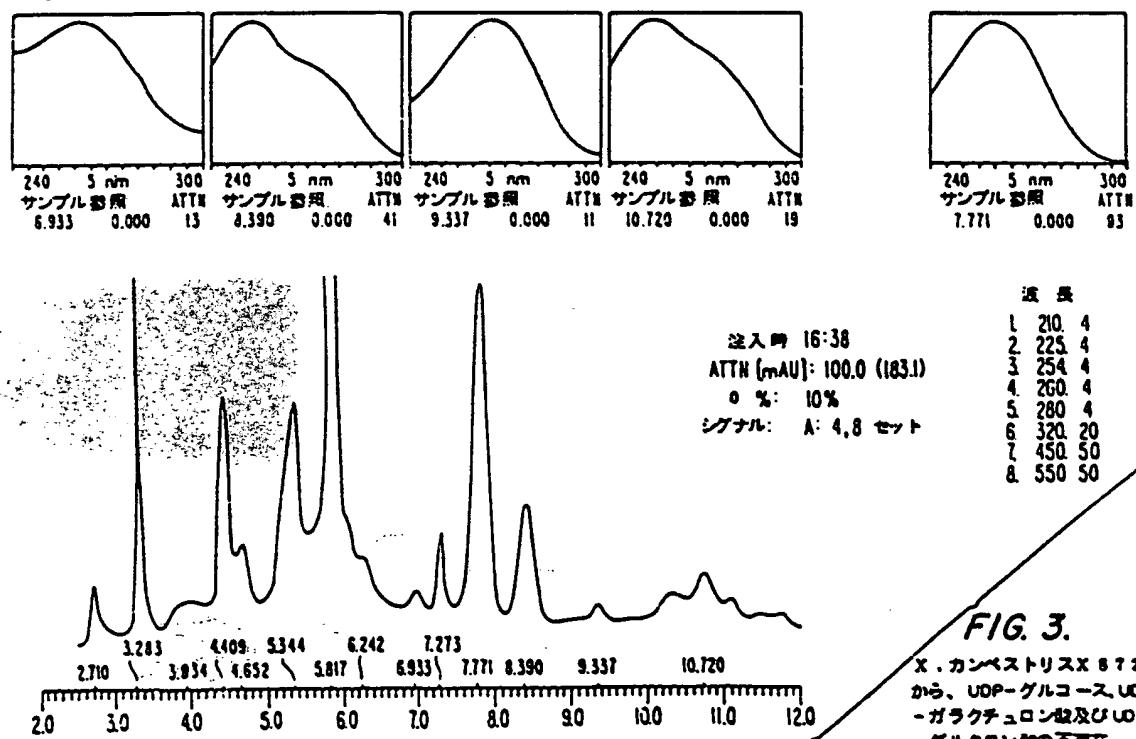


FIG. 3.
X・カンペストリスX 872
から、 UDP-グルコース、 UDP-
ガラクチュロン酸及び UDP-
グルクロン酸の不在

FILE: X869MARS'5
DATE: 03/05/1985

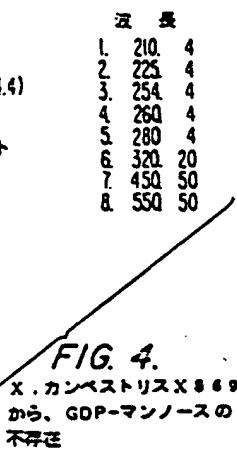
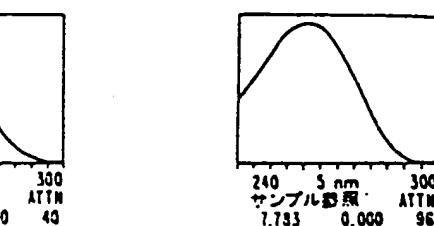
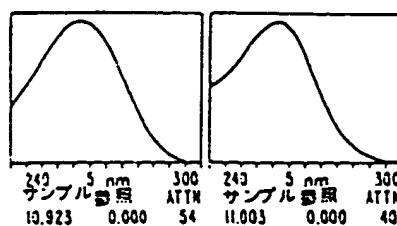
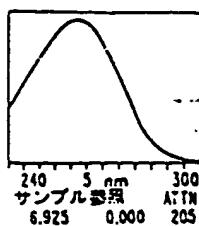
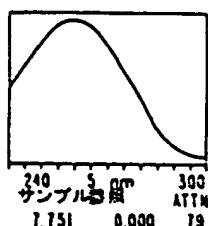
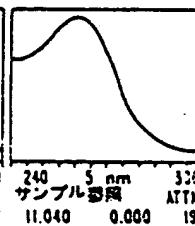
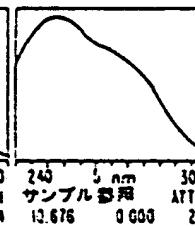
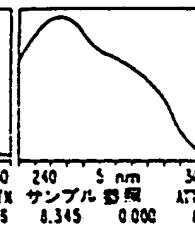
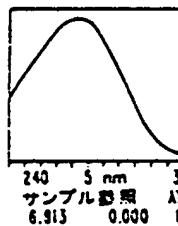


FIG. 4.
X. カンペストリス X 869
から、GDP-マンノースの
不存性

FILE: X871MARS'5
DATE: 03/05/1985



注入時: 15:34
ATTN [mAU]: 1000 (185.2)
o %: 10%
シグナル: A: 4.8 セット H
1. 210 4
2. 225 4
3. 254 4
4. 260 4
5. 280 4
6. 320 20
7. 450 50
8. 550 50

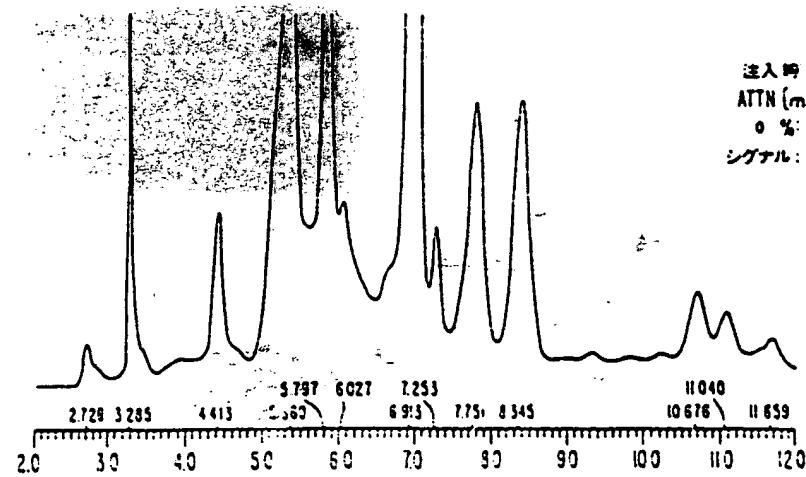


FIG. 5.
X. カンペストリス X 871
から、 UDP-ガラクチュロン
酸及び UDP-グルクロン酸の
不存性

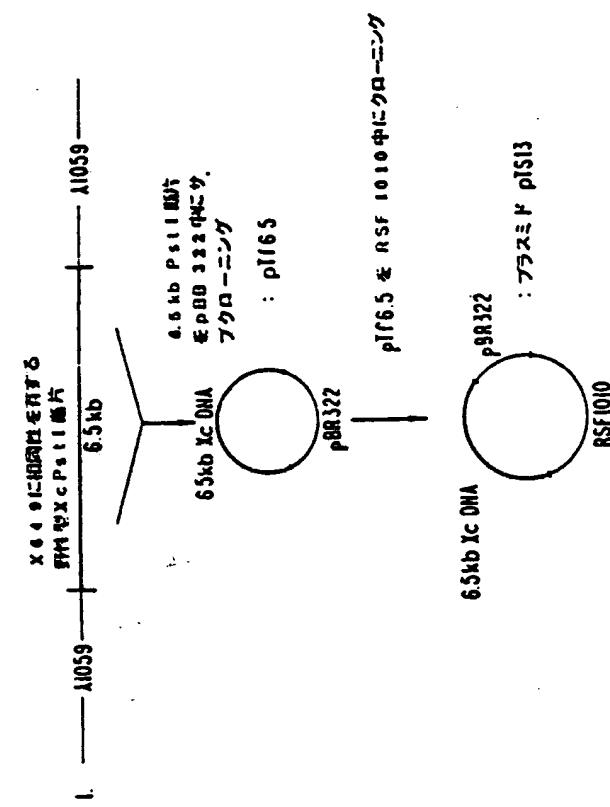
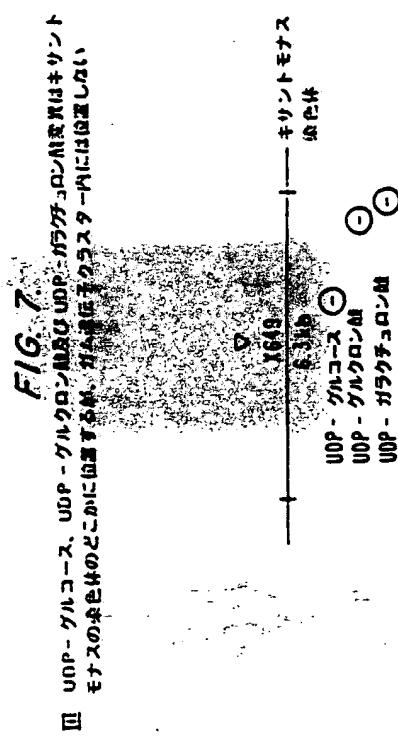
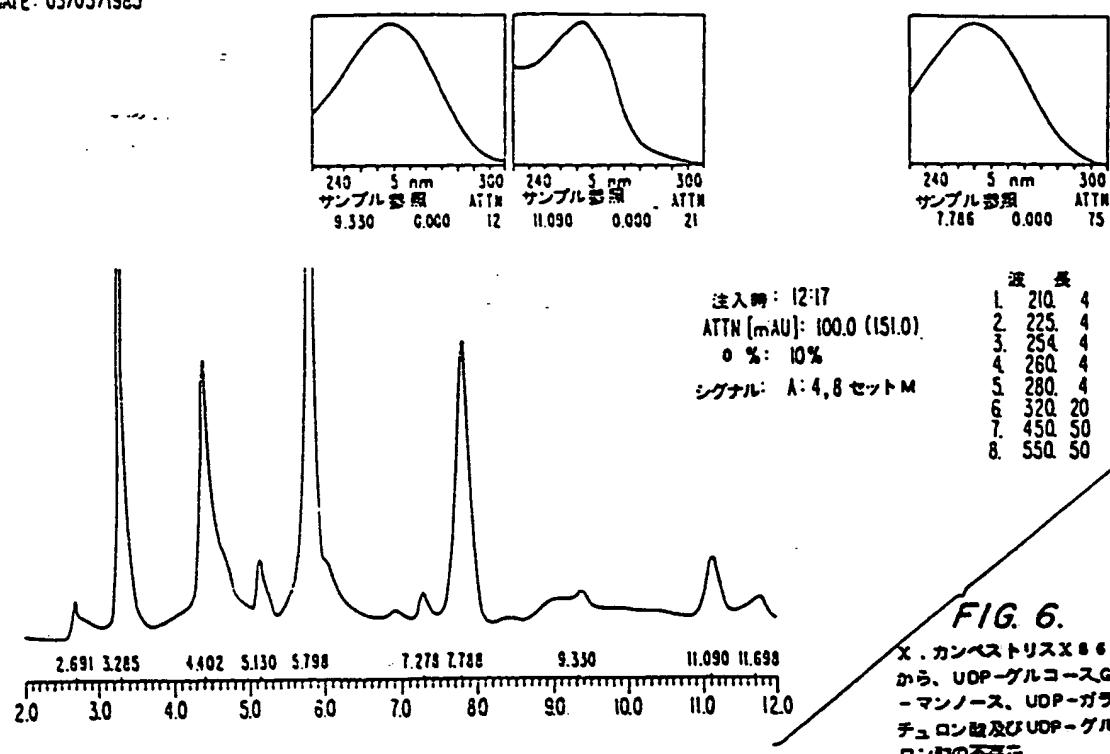
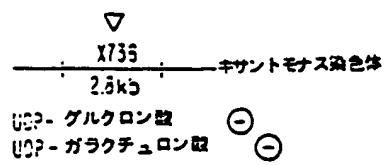


FIG. 8.

II. UDP-グルクロン酸及びUDP-ガラクトュロン酸異性はキサントモナス染色体のどこかに位置するが、ガム遺伝子クラスター内には位置しない



X736と相同性を有する
野生型 Xc Sal I 断片

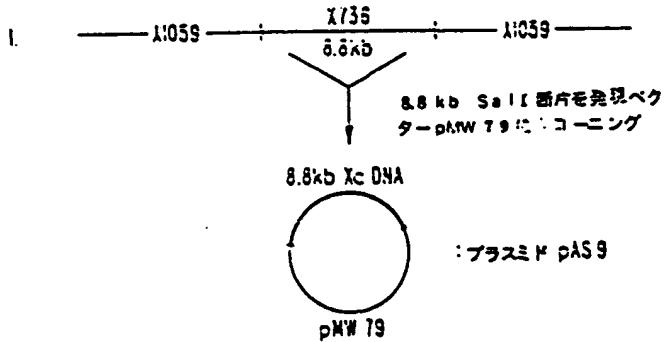
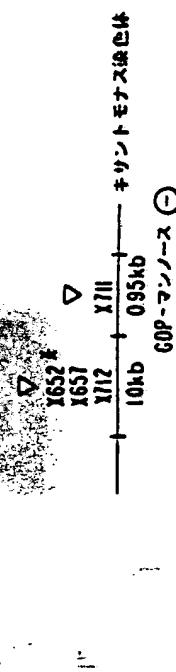


FIG. 9.

In 10-Ⅱ 染色体は、新たに見出されたクロチド残基
I. UDP-マンノース残基はキサントモナス染色体上に存在しているが、ガム
遺伝子を含むDNA領域には存在しない。



X1059 はさらに UDP-グルコース及び UDP-ガラクトースの結合位にも欠損している

A. 野生型キサントモナス染色体の大断片を X1059 中にバックージ

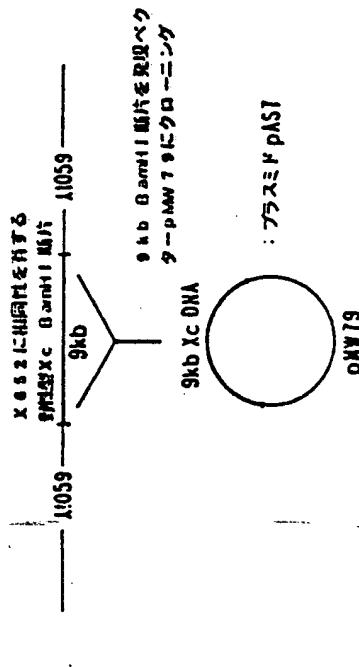


FIG. 10

0.25mM KNO₃と共にインキュベートされた
バラコッカス・デニトリフィカンスからの抽出物
のクロマトグラム

FILE: 1774IN0606
DATE: 06/07/1984
注入時: 05:00
ATTN [mAU]: 25.0 (28.6)
%

シグナル: A: 4.8

	波長 (nm)
1.	210.4
2.	225.4
3.	254.4
4.	260.4
5.	280.4
6.	320.20
7.	450.50
8.	550.100

hp 1040A

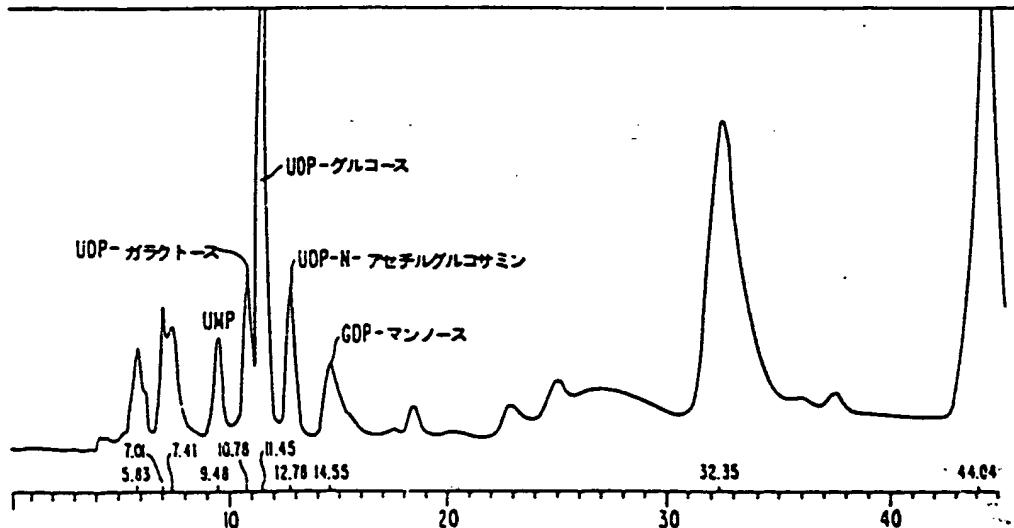


FIG. 11

バラコッカス・デニトリフィカンスからの抽出物中に見出される化合物のスペクトル。この図中のすべてのヌクレオチド成分はウリジン化合物の特徴的なスペクトルを有する。

FILE:

1774IN0606

hp 1040A

DATE:

06/07/1984

06/07/1984

スペクトル [min]:

1774IN0606

吸収 [min]:

06/07/1984

06/07/1984

ATTN [mAU]:

1774IN0606

%

12.7795

9.4762 10.7582 11.4488 12.7795

11.5 11.7 33.5 91

9.9 (219/2) 10.0 (219/2) 28.7 (261/2) 7.8 (261/2)

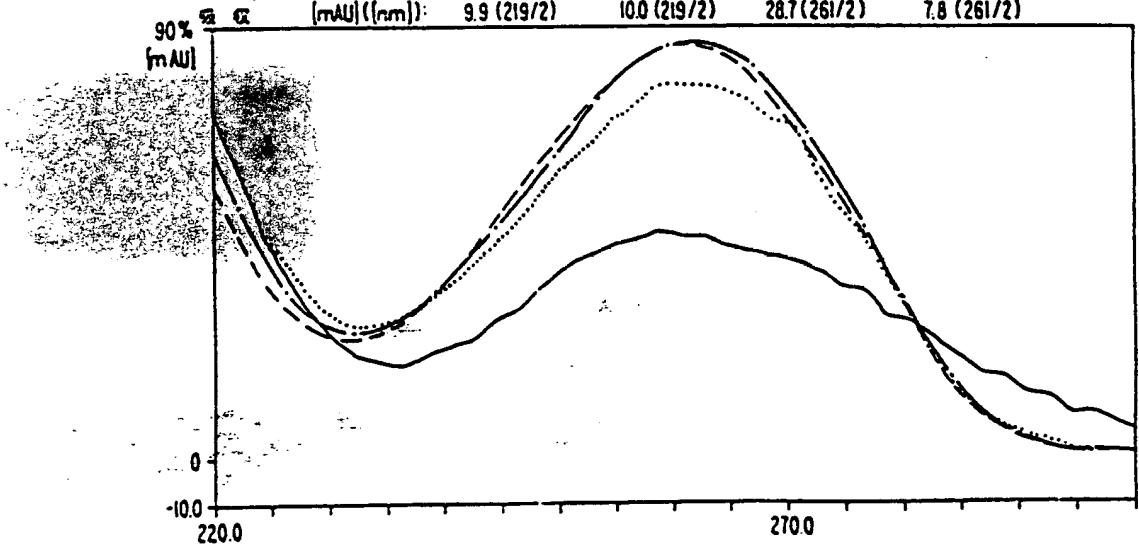
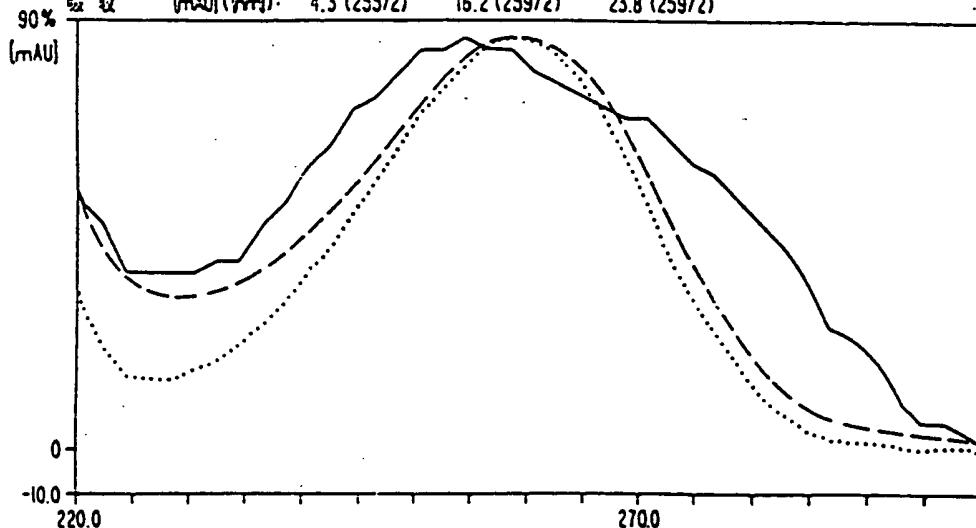


FIG. 12 パラコッカス・デニトリフィカンスからの抽出物に見出される化合物のスペクトル。各化合物のスクレオチド成分はそのスペクトルに基いて同定された。

FILE:	GUANOSINE 17741N0606	ADENOSINE 17741N0606	ADENOSINE 17741N0606
DATE:	06/07/1984	06/07/1984	06/07/1984
スペクトル [min]:	14.5545	32.3535	44.0382
吸 収 [min]:	なし	なし	なし
ATTN (mAU):	5.0	18.9	27.8
吸 収 (mAU) (corr):	4.3 (255/2)	16.2 (259/2)	23.8 (259/2)

HP1040A



④Int.Cl.
//
(C 12 P 19/30
(C 12 R 1:145)
(C 12 P 19/30
(C 12 R 1:40)
(C 12 P 19/30
(C 12 R 1:19)
(C 12 P 19/30
(C 12 R 1:01)
(C 12 N 1/20
(C 12 R 1:19)
(C 12 N 1/20
(C 12 R 1:64)
(C 12 N 15/00
(C 12 R 1:64)

識別記号 厅内整理番号

優先権主張 ②1987年3月23日③米国(US)④029,091
⑤発明者 バンダースライス、レベツカ、
ダブリュ。 アメリカ合衆国、コロラド 80303、ボルダー、タントラ
バ
ク サークル 1011